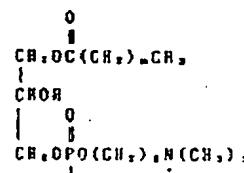
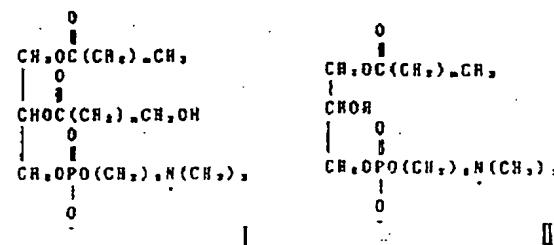


# EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 01258691  
PUBLICATION DATE : 16-10-89

APPLICATION DATE : 06-04-88  
APPLICATION NUMBER : 63083136

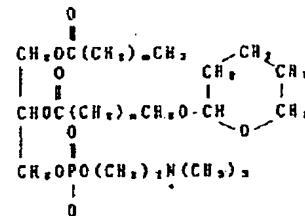
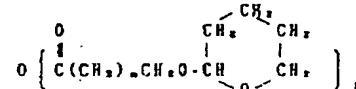


APPLICANT : NIPPON OIL & FATS CO LTD;

INVENTOR : NAKAYAMA MASAHIRO;

INT.CL. : C07F 9/10 C07F 9/09 // A61K 31/685

TITLE : PHOSPHOLIPID DERIVATIVE AND  
PRODUCTION THEREOF



ABSTRACT : NEW MATERIAL: A compound expressed by formula I (m and n are 1-22).

EXAMPLE: 1-Octadecanoyl-2-(9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy) nonanoyl-3-glycero-phosphorylcholin.

USE: An immune activator.

PREPARATION: A 1-monoacyl-3-glycerophosphorylcholin is reacted with an aliphatic anhydride having a protecting group expressed by the formula III to provide a phospholipid derivative expressed by formula IV, which is then treated with an acid.

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 平1-258691

⑫ Int. Cl.

C 07 F 9/10  
9/09  
// A 61 K 31/685

識別記号

府内整理番号  
B-6917-4H  
M-6917-4H

⑬ 公開 平成1年(1989)10月16日

A B D

7431-4C審査請求 未請求 請求項の数 4 (全8頁)

⑭ 発明の名称 リン脂質誘導体及びその製造方法

⑮ 特願 昭63-83136

⑯ 出願 昭63(1988)4月6日

⑰ 発明者 中村哲也 茨城県つくば市春日2丁目20番3号

⑰ 発明者 沢田英夫 茨城県つくば市梅園2丁目24番5号

⑰ 発明者 中山雅陽 茨城県つくば市梅園2丁目15番5号

⑰ 出願人 日本油脂株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号

⑰ 代理人 弁理士舟橋榮子

明細書

(式中、mは1~22、nは1~22である。)

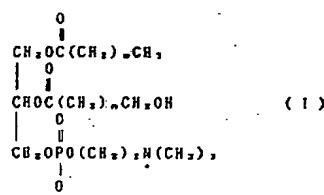
1. 発明の名称

リン脂質誘導体及びその製造方法

で表されるリン脂質誘導体。

2. 特許請求の範囲

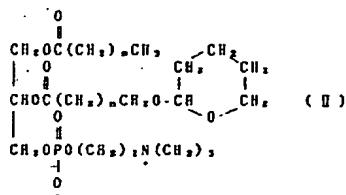
(1) 次の一般式:



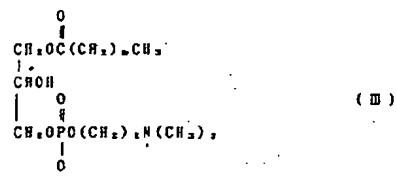
(式中、mは1~22、nは1~22である。)

で表されるリン脂質誘導体。

(2) 次の一般式:

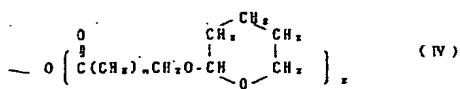


(3) 次の一般式



(式中、mは1~22である。)

で表される1-モノアシル-3-グリセロホスホリルコリンと、次の一般式:

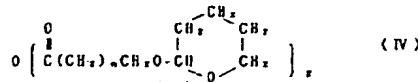


(式中、nは1~22である。)

で表される保護基を有する脂肪酸無水物とを反応させ請求項2記載のリン脂質誘導体(2)を得ることを特徴とするリン脂質誘導体の製造方法。

(4) 次の一般式

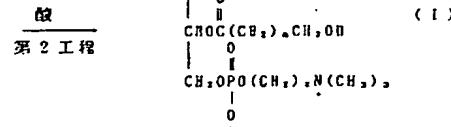
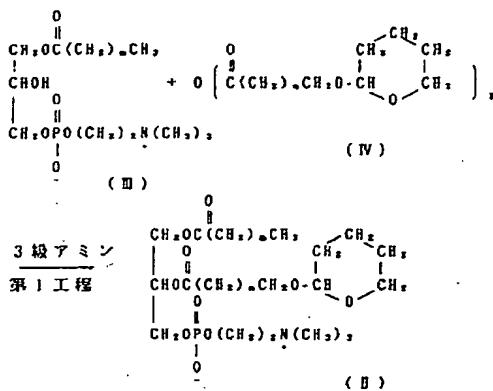




(式中、nは1~22である。)

で表される保護基を有する脂肪酸無水物と反応させ、式(II)の化合物を得る。次に酸処理を行うことで、ピラニル基を脱離させ、目的とするリン脂質(1)を得る。

合成経路を下図に示す。



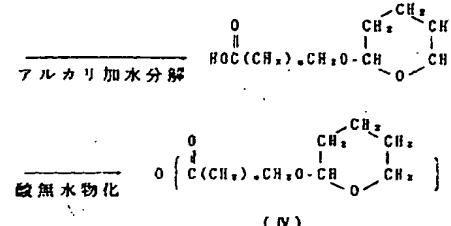
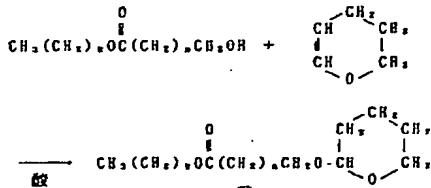
(式中、mは1~22、nは1~22である。)

第1工程の反応における反応温度及び反応時間は通常は30~100℃、2~48時間であるが、より好ましくは40~70℃で、2~8時間である。30℃未満又は2時間未満では未反応物が多く、100℃を超えた48時間を超える場合は副生成物が多くなるなどで収率が低下する。第2工程の酸処理については、反応温度及び反応時間は、通常0℃~70℃、1~10時間であるが、より好ましくは30~50℃、2~5時間である。0℃未満又は1時間未満では未反応物が多く、70℃を超えた10時間を超える場合は副生成物が多くなるなどで収率が低下する。

一般式(III)で表される1-モノアシル-3-

グリセロホスホリルコリンとしては、例えば1-プロバノイル-3-グリセロホスホリルコリン、1-ヘキサノイル-3-グリセロホスホリルコリン、1-メナノイル-3-グリセロホスホリルコリン、1-ドデカノイル-3-グリセロホスホリルコリン、1-テトラデカノイル-3-グリセロホスホリルコリン、1-ヘキサデカノイル-3-グリセロホスホリルコリン、1-オクタデカノイル-3-グリセロホスホリルコリン、1-エイコサノイル-3-グリセロホスホリルコリン、1-ドコサノイル-3-グリセロホスホリルコリンなどが挙げられる。

酸無水物(IV)は以下の方法により得ることができる。合成経路を下図に示す。



(式中、kは0~4、nは1~22である。)

最初の付加反応における反応温度及び、反応時間は、通常0~60℃、1~7時間であるが、より好ましくは10~30℃、1~3時間である。0℃未満又は1時間未満では未反応物が多く、50℃を超えた7時間を超える場合は副生成物が多くなるなどで収率が低下する。

アルカリ加水分解の反応は、通常10~70℃、1~24時間であるが、より好ましくは20~50℃、2~10時間である。10℃未満又は1時間未満では未反応物が多く、70℃を超えた24時間を超える場合は副生成物が多くなるなどで収率が低下する。

酸無水物化の反応は通常10~70℃、1~24時間

であるが、より好ましくは30~50℃で、3~12時間である。10℃未満又は1時間未満では未反応物が多く、70℃を超えた場合24時間を超える場合は副生成物が多くなるなどで収率が低下する。

酸無水物 (IV) としては、3-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)プロピオン酸無水物、6-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ヘキサン酸無水物、8-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)オクタン酸無水物、9-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ノナン酸無水物、10-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)デカン酸無水物、12-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ドデカン酸無水物、14-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)テトラデカン酸無水物、16-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ヘキサデカン酸無水物、18-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)オクタデカン酸無水物、20-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-

イル)オキシ)エイコサン酸無水物、22-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ドコサン酸無水物などが挙げられる。

また、本発明の製造方法において第1工程で用いる3級アミンとしては、トリエチルアミン、トリメチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジンなどが挙げられる。第2工程の酸処理に用いる酸としては、塩酸、硫酸、酢酸、トリフロロ酢酸、リン酸、p-トルエンスルホン酸などが挙げられる。

反応終了後、反応混合物を還流し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィ等の分離手段により精製することで、目的物(I)、(II)の純品を得ることができる。

#### (発明の効果)

本発明のリン脂質誘導体は新規な物質であり、免疫賦活剤としての効力を有し、薬理学的に極めて有用な化合物である。

また、本発明の新規なリン脂質誘導体の製造方法は、少ない工程数で、しかも容易に入手できる

原料を使用して、高収率・高純度で前記リン脂質誘導体を得ることができ、工業的に極めて有用な製法である。

#### (実施例)

以下、実施例及び比較例をあげて本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例1

攪拌子の入った200mL活栓付ナス型フラスコに、9-ヒドロキシノナン酸メチル14.0g、p-トルエンスルホン酸204mg、3,4-ジヒドロ-2H-ピラン12.3g及びベンゼン130mLを導入し、室温で2時間攪拌した。反応終了後、減圧下でベンゼンを留去した。次いで反応混合物をシリカゲルカラムクロマト(展開液: n-ヘキサン: ジエチルエーテル=80: 20(容積比))で分離したところ、9-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ノナン酸メチル12.45g(収率61.6%)を得た。

攪拌子の入った100mL活栓付ナス型フラスコに9-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)

オキシ)ノナン酸メチル5.86g、水酸化カリウム2.23g及び、水30mLを導入し室温で12時間攪拌した。反応終了後、ジエチルエーテルで洗浄した。反応液を2Nの硫酸水溶液でpH3~4とした後、ジエチルエーテルで抽出し濃縮した。濃縮液をシリカゲルカラムクロマト(展開液: n-ヘキサン: ジエチルエーテル=70: 30(容積比))で分離したところ、39-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ノナン酸4.03g(収率72.5%)を得た。

攪拌子の入った100mL活栓付ナス型フラスコに9-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ノナン酸3.50g、N,N'-ジシクロヘキシカルボジイミド2.81g及び、四塩化炭素60mLを導入し、室温で15時間、反応させた。反応終了後、析出する白色固体を通過により除去して、9-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ノナン酸無水物の四塩化炭素溶液を得た。

過量の四塩化炭素溶液を採集し、減圧下で四塩化炭素を留去したところ、9-((テトラヒドロ-

2 H-ビラン-2-イル) オキシ) ノナン酸無水物2.48gを得た。これに、1-オクタデカノイル-3-グリセロホスホリルコリン1.30g、N,N'-ジメチルアミノピリジン0.624g及び、ジメチルスルホキシド12mLを加え、50℃で6時間攪拌した。反応終了後、シリカゲルカラムクロマトにより、最初はアセトンを展開液として用い、ジメチルスルホキシドを流出させた。次に、クロロホルム：メタノール：7Nアンモニア水=60:20:3(容積比)を展開液として用いることで、目的とする1-オクタデカノイル-2-(9-((テトラヒドロ-2 H-ビラン-2-イル) オキシ) ノナノイル)-3-グリセロホスホリルコリン1.64g(収率86.5%)を得た。

マススペクトル、赤外スペクトル及び元素分析の結果は次の通りであった。

マススペクトル( <i>m/z</i> )	: 764 ([M+H] <sup>+</sup> )
赤外スペクトル： (cm <sup>-1</sup> )	: 1040~1200 (C-O-C-O-C) 1250~1300 (P=O)
	1740 (C=O 伸縮振動)

## 元素分析：

(計算値) :	C 62.91%	H 10.22%
	N 1.83%	P 4.06%
(実測値) :	C 62.12%	H 11.01%
	N 1.81%	P 4.31%

なお、リン脂質の2位の炭素のエステル結合を特異的に分解する酵素を用いて、2位の炭素に結合した基を確認した。

上記の方法で合成した化合物100mgを、ヘビ毒ホスホリバーゼA<sub>A</sub>(*naja naja venom*; SIGMA Chem. Corp.) 0.3mL、5%CaCl<sub>2</sub>水溶液0.1mL及びエチルエーテル10mLの混合液に加え、室温で1晩攪拌して反応させた。反応後、シリカゲル薄層クロマトグラフィー(展開液：クロロホルム：メタノール：水=65:25:4(容積比))で分離した。R<sub>f</sub>値0.90付近の脂肪酸成分のスポットを分取してメタノールで抽出した。この脂肪酸成分を常法によりメチルエステル化した後、ガスクロマトグラフィーで分析した結果、2位の炭素に結合した9-((テトラヒドロ-2 H-ビラン-2-イル) オキ

シ) ノナン酸が、95.8%であった。

以上の分析結果より、1-オクタデカノイル-2-(9-((テトラヒドロ-2 H-ビラン-2-イル) オキシ) ノナノイル)-3-グリセロホスホリルコリンが合成されていることを確認した。

## 実施例2

9-ヒドロキシノナン酸メチルの代わりに、6-ヒドロキシヘキサン酸メチル10.5gを用い、他の試薬は実施例1のモル比に従い適量を用い、実験方法を実施例1に従ったところ、6-((テトラヒドロ-2 H-ビラン-2-イル) オキシ) ヘキサン酸メチル11.7g(収率70.7%)を得た。

6-((テトラヒドロ-2 H-ビラン-2-イル) オキシ) ヘキサン酸メチル6.37gを用い、他の試薬は実施例1のモル比に従い適量を用い、実験方法を実施例1に従ったところ、6-((テトラヒドロ-2 H-ビラン-2-イル) オキシ) ヘキサン酸4.98g(収率83.2%)を得た。

6-((テトラヒドロ-2 H-ビラン-2-イル) オキシ) ヘキサン酸を実施例1に従い酸無水物化

した。

1-オクタデカノイル-3-グリセロホスホリルコリンの代わりに1-ヘキサデカノイル-3-グリセロホスホリルコリン1.10gを用い、他の試薬は、実施例1のモル比に従い適量を用いた。実験方法を実施例1と同様に行ったところ、1-ヘキサデカノイル-2-(6-((テトラヒドロ-2 H-ビラン-2-イル) オキシ) ヘキサノイル)-3-グリセロホスホリルコリン1.29g(収率83.8%)を得た。

マススペクトル、赤外スペクトル及び元素分析の結果は次の通りであった。

マススペクトル( <i>m/z</i> )	: 694 ([M+H] <sup>+</sup> )
赤外スペクトル： (cm <sup>-1</sup> )	: 1040~1200 (C-O-C-O-C) 1250~1300 (P=O)
	1740 (C=O 伸縮振動)

## 元素分析：

(計算値) :	C 60.61%	H 9.81%
	N 2.02%	P 4.47%
(実測値) :	C 59.71%	H 10.31%

特開平1-258691(6)

N 1.90% P 4.19%

得られたリン脂質の2位の炭素に結合した6-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ヘキサン酸を実施例1に従ってガスクロマトグラフィーで分析した結果、95.3%であった。

以上の分析結果より、1-ヘキサデカノイル-2-((6-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ヘキサノイル)-3-グリセロホスホリルコリンが合成されていることが確かめられた。

実施例3

9-ヒドロキシノナン酸メチルの代わりに12-ヒドロキシデカン酸メチル12.01gを用い、他の試薬は実施例1のモル比に従い適量を使用した。実験方法を実施例1に従ったところ、12-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)デカン酸メチル9.36g(収率57.1%)を得た。これを7.83g用い、他の試薬は実施例1のモル比に従い適量を用い、実験方法を実施例1に従ったところ、12-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ノナノイル-3-グリセロホスホリルコリンが合成されていることが確かめられた。

(実測値) : C 61.61% H 10.51%  
N 1.71% P 4.03%

得られたリン脂質の2位の炭素に結合した12-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)デカン酸を、実施例1に従ってガスクロマトグラフィーで分析した結果、93.8%であった。

以上の分析結果より、1-ドカノイル-2-((12-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)デカノイル)-3-グリセロホスホリルコリンが合成されていることが確かめられた。

実施例4

攪拌子の入った50mL活栓付ナス型フラスコに、9-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ノナン酸無水物2.582g、4-ジメチルアミノピリジン0.647g、1-オクタデカノイル-3-グリセロホスホリルコリン1.585g及びジメチルスルホキシド10mLを加え、50°Cで7.5時間反応させた。

反応終了後、反応混合物をシリカゲルカラムクロマト(展開液:アセトニンの後、クロロホルム:

ル)オキシ)ドデカン酸6.23g(収率83.3%)を得た。これを実施例1に従い酸無水物化した。

1-オクタデカノイル-3-グリセロホスホリルコリンの代わりに1-ドカノイル-3-グリセロホスホリルコリン1.15gを用い、他の試薬は、実施例1のモル比に従い適量を用いた。実験方法を実施例1と同様に行ったところ、1-ドカノイル-2-((12-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ドカノイル)-3-グリセロホスホリルコリン1.50g(収率79.4%)を得た。

マススペクトル、赤外スペクトル及び元素分析の結果は次の通りであった。

マススペクトル( $m/z$ ) : 722 ((M + H)<sup>+</sup>)

赤外スペクトル: 1040~1200 (C-O-C-O-C)  
(cm<sup>-1</sup>)

1250~1300 (P=O)

1740 (C=O 伸縮振動)

元素分析:

(計算値) : C 61.58% H 9.99%  
N 1.94% P 4.30%

メタノール: 1Nアンモニア水 = 60: 20: 3 (容積比)により分離し、1-オクタデカノイル-2-((9-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ノナノイル)-3-グリセロホスホリルコリン2.003g(収率86.5%)を得た。

次に攪拌子の入った100mL活栓付ナス型フラスコに1-オクタデカノイル-2-((9-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ノナノイル)-3-グリセロホスホリルコリン0.712g及び85%酢酸水溶液50mLを加え、40°Cで3時間反応させた。

反応終了後、反応混合液を濾絞し、シリカゲルカラムクロマト(展開液:クロロホルム:メタノール:水 = 2: 5: 1 (容積比))を用いて分離した。その結果1-オクタデカノイル-2-((9-ヒドロキシノナノイル)-3-グリセロホスホリルコリン0.366g(収率57.8%)を得た。

マススペクトル、赤外スペクトル及び元素分析の結果は次の通りであった。

マススペクトル( $m/z$ ) : 680 ((M + H)<sup>+</sup>)

赤外スペクトル : 1040~1200 (C-O-C-O-C) (cm <sup>-1</sup> )	
1250~1300 (P=O)	
1740 (C=O 伸縮振動)	
3400 (O-H 伸縮振動)	

## 元素分析 :

(計算値) : C 61.86%	H 10.46%
N 2.06%	P 4.57%
(実測値) : C 62.11%	H 10.69%
N 1.98% P 4.39%	

なお、リン脂質の2位のエステル結合を特異的に分解する酵素を用いて、2位の炭素に結合した基を確認した。

上記の方法で合成した化合物 100mg を、ヘビ毒ホスホリバーゼ A<sub>2</sub> (naja naja venom; SIGMA Chem. Corp.) 0.3mg、5% CaCl<sub>2</sub> 水溶液 0.1ml 及びジエチルエーテル 10ml の混合液に加え、室温で 1 晩攪拌して反応させた。

反応後、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (展開液: クロロホルム: メタノール: 酢酸: 水 = 50: 25: 8: 4 (容積比)) で分別した。R<sub>f</sub> 値

0.85付近の脂肪酸成分のスポットを分取して、メタノールで抽出した。この脂肪酸成分を常法によりエステル化した後ガスクロマトグラフィーで分析した結果、標品の 9-ヒドロキシノナン酸を同様にエステル化した化合物と同じピークが 93.8% の純度で得られた。

以上の分析結果より、1-オクタデカノイル-2-(9-ヒドロキシノノイル)-3-グリセロホスホリルコリンが合成されていることが確かめられた。

## 実施例 5

9-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ノナン酸無水物の代わりに、6-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ヘキサン酸無水物 1.63g を、また 1-オクタデカノイル-3-グリセロホスホリルコリンの代わりに、1-ヘキサデカノイル-3-グリセロホスホリルコリン 0.981g、および 4-ジメチルアミノビリジン 0.485g を用いた以外は、実施例 4 と同様な条件で反応させ、同様な操作方法により、目的の 1-

ヘキサデカノイル-2-(6-ヒドロキシヘキサノイル)-3-グリセロホスホリルコリン 0.725g (収率 60.1%) を得た。

マススペクトル、赤外スペクトル、元素分析の結果は次の通りであった。

マススペクトル (m/z) : 610 ((M + H) <sup>+</sup> )	
赤外スペクトル : 1040~1200 (C-O-C-O-C) (cm <sup>-1</sup> )	
1250~1300 (P=O)	
1740 (C=O 伸縮振動)	
3400 (O-H 伸縮振動)	

## 元素分析 :

(計算値) : C 59.11%	H 9.85%
N 2.30%	P 5.09%
(実測値) : C 58.78%	H 10.03%
N 2.19% P 5.01%	

なお、リン脂質の2位の炭素のエステル結合を特異的に分解する酵素を用いて、2位の炭素に結合した基を実施例 4 と同様に確認した。その結果

2位の 6-ヒドロキシヘキサン酸の純度が、95.1% であることが、ガスクロマトグラフィーにより

わかった。

以上の分析結果より、1-ヘキサデカノイル-2-(6-ヒドロキシヘキサノイル)-3-グリセロホスホリルコリンが合成されていることが確かめられた。

## 実施例 6

9-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ノナン酸無水物の代わりに、12-((テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)ドデカン酸無水物 1.71g を、又、1-オクタデカノイル-3-グリセロホスホリルコリンの代わりに 1-デカノイル-3-グリセロホスホリルコリン 0.681g、4-ジメチルアミノビリジン 0.353g を用いた他は実施例 4 に述べた方法と同様の条件で反応させ、同様な操作により目的の 1-デカノイル-2-(12-ヒドロキシドデカノイル)-3-グリセロホスホリルコリン 0.435g (収率 43.1%) を得た。

マススペクトル、赤外スペクトル及び元素分析の結果は次の通りであった。

特開平1-258691 (8)

マススペクトル(*e/z*) : 610. ((M + H)<sup>+</sup>)

赤外スペクトル : 1040~1200 (C-O-C-O-C)  
(cm<sup>-1</sup>)

1250~1300 (P=O)

1740 (C=O 伸縮振動)

3400 (O-H 伸縮振動)

元素分析 :

(計算値) : C 59.11% H 9.85%

N 2.30% P 5.09%

(実測値) : C 59.01% H 9.92%

N 2.50% P 4.87%

なお、リン脂質の2位の炭素に結合した基を実施例4と同様な方法により測定したところ、12-ヒドロキシドデカン酸の純度が、95.3%であることがガスクロマトグラフィーによりわかった。

以上の分析結果より1-デカノイル-2-(12-ヒドロキシドデカノイル)-3-グリセロホスホリルコリンが合成されていることが確かめられた。

比較例1

9-((テトラヒドロ-2H-ビラン-2-イル)

オキシ)ノナン酸無水物の代わりに、9-ヒドロキシノナン酸と、N,N'-ジシクロヘキシカルボジイミドの混合物を用いた他は実施例4に従って操作を行ったところ、1-オクタデカノイル-2-(9-ヒドロキシノナノイル)-3-グリセロホスホリルコリンは得られなかった。

比較例2

9-((テトラヒドロ-2H-ビラン-2-イル)

オキシ)ノナン酸無水物の代わりに、9-アセトキシノナン酸無水物を用いた他は実施例4に従って操作を行ったところ、アセチル基を選択的に除去することが困難なため、1-オクタデカノイル-2-(9-ヒドロキシノナノイル)-3-グリセロホスホリルコリンは得られなかった。

特許出願人 日本油脂株式会社

代理人 弁理士舟橋英子